

# ГЕНЕТИЧЕСКАЯ РЕКОНСТРУКЦИЯ СИСТЕМЫ СВЕТОЗАЩИТЫ

## У *CHLAMYDOMONAS REINHARDI*

Лаборатория генетики и цитогенетики микроорганизмов ЛГУ

### В в е д е н и е

Свет участвует в разнообразных физиологических процессах - от зрения до фотосинтеза, - характерных для нормальной жизнедеятельности организмов. Однако при определенных условиях свет может стать неблагоприятным фактором. Более того, у представителей разнообразных таксономических групп существуют мутанты, для которых облучение видимым светом представляет опасность даже в условиях, оптимальных для выращивания исходной дикой формы (Krinsky, 1968). Следовательно, живые организмы, в норме подверженные действию света, располагают мощной защитной системой, которая находится под генетическим контролем.

Так как фотоингибирование затрагивает основные жизненные функции, а большинство биологически важных макромолекул, таких как полипептиды и нуклеиновые кислоты, прозрачны по отношению к видимому свету, повреждающее действие света должно быть опосредовано целой серией промежуточных реакций. Совокупность реакций, приводящих к окислению тех или иных компонентов клетки за счет энергии возбужденных светом молекул пигментов-фотосенсибилизаторов, объединяется термином "фотодинамическое действие". Эндогенными фотосенсибилизаторами являются вещества флавиновой и порфириновой природы.

Такое представление о фотоингибировании приводит к заключению, что система реакций, защищающих организм от потенциально летального действия видимого света, должна быть эволюционно наиболее развитой у растений и водорослей, обладающих 2-й фотохимической системой фотосинтеза. Действительно, такие условия, как присутствие эндогенно выделяющегося кислорода, равно как и наличие больших количеств хлорофилла - эффективного фотосенсибилизатора, делают фотоокислительные процессы очень высоковероятными и тем самым представляют постоянную угрозу для жизнедеятельности клеток растений и водорослей.

Удобной моделью для экспериментального изучения системы светозащиты фотосинтезирующих организмов служит коллекция светочувствительных мутантов зеленой водоросли *Chlamydomonas reinhardtii*. Биохимико-биофизическое изучение этих мутантов позволяет установить, какие компоненты клетки обеспечивают устойчивость водоросли к существованию на свету. На этом пути была, например, подтверждена защитная роль каротиноидов (Sager, Zalokar, 1958; Stolbova, 1975), продемонстрированная ранее для фотосинтезирующих бактерий.

Не менее интересной задачей, чем выявление отдельных компонентов

системы светозащиты, представляется выяснение вопроса, каким образом взаимодействуют эти компоненты, поскольку без понимания специфики их взаимодействия вряд ли удастся обнаружить те эволюционные преобразования, которые имели место при возникновении эукариотических фотосинтезирующих организмов. Для этой цели можно использовать ту же коллекцию светочувствительных мутантов. Один из путей состоит в получении светостойчивых ревертантов, в выявлении у них супрессорных мутаций и в изучении самостоятельных фенотипических эффектов этих мутаций. В этом случае в нашем распоряжении оказывается набор функционирующих систем светозащиты, реконструированных на основе сочетания различных мутаций. Сопоставляя физиологические характеристики этих систем с фенотипическим проявлением каждой из мутаций, можно решить проблему взаимодействия элементов нормальной системы светозащиты. Расширение коллекции анализируемых форм за счет ревертантов может оказаться полезным и на более раннем этапе расчленения системы светозащиты на составляющие ее компоненты, особенно в случае плеiotропности действия исходной мутации или при комбинации в генотипе светочувствительного штамма более чем одного мутационного изменения, влияющего на изучаемую совокупность признаков.

Прежде чем изложить результаты работы в этом направлении, следует несколько более подробно остановиться на механизмах фотодинамического действия и светозащитной функции каротиноидов, поскольку уже это рассмотрение позволяет составить самое общее представление о компонентах системы светозащиты фотосинтезирующих организмов, которое можно принять в качестве рабочей гипотезы.

#### Светозащитная функция каротиноидов

Значительный прогресс в изучении светостойчивости живых систем, в том числе и в истолковании результатов опытов с мутантами, стал возможен благодаря работам Фута (Foote, 1968), одним из первых пришедшего к пониманию того, что множество гипотетических механизмов фотодинамического действия (Spikes, 1968), находивших экспериментальное подтверждение на различных моделях, содержит не взаимоисключающие, но лишь крайние варианты протекания одних и тех же процессов в зависимости от физико-химических констант реагирующих молекул и от внешних условий.

Итак, свет поглощается молекулой фотосенсибилизатора, в результате чего эта молекула переходит в возбужденное состояние. Ее судьба в этом состоянии составляет суть дальнейших превращений. Возбужденный сенсибилизатор может непосредственно реагировать либо с субстратом реакции (путь Б), либо с молекулярным кислородом (путь А) (рис. 1, а). Хотя оба пути ведут в конечном итоге к фотоокислению, они неравноценны в смысле своей биологической значимости. В то время как *in vitro*, в молекулярных растворах, преобладает тип взаимодействия с кислородом, мембранная организация биологических систем заставляет предполагать, что значительную долю может составлять альтернативный путь.

На основании экспериментов со светочувствительным мутантом фотосинтезирующей бактерии Систром с сотр. (Sistrom e.a., 1956) предположили, что каротиноиды могут защищать клетку от гибели на свету.

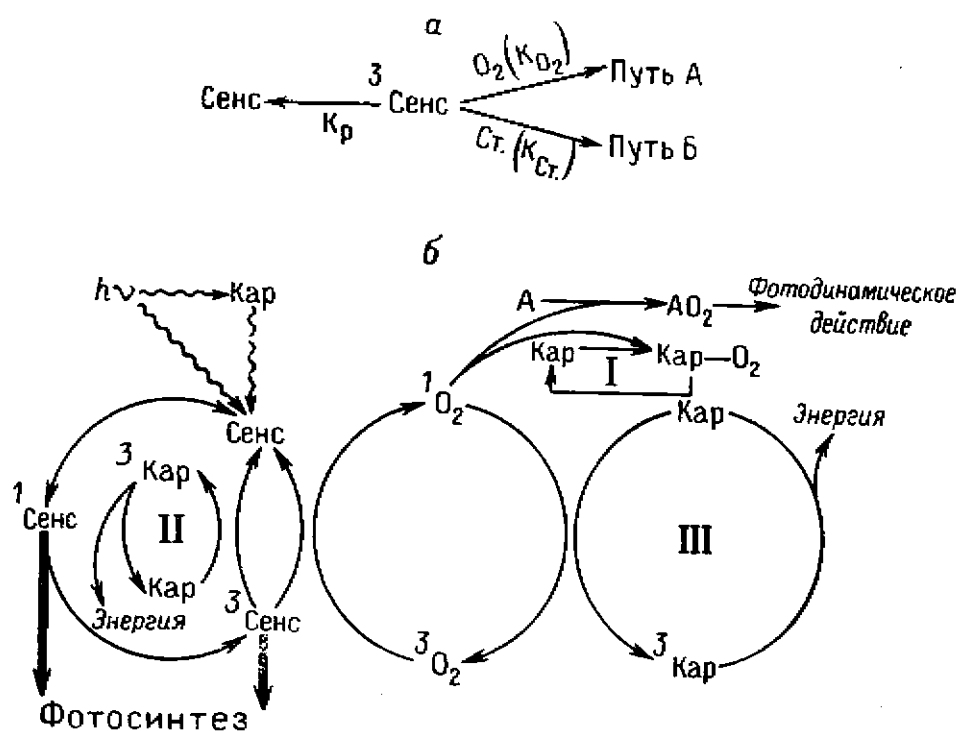


Рис.1. Механизмы фотодинамического действия (а) (Foote, 1958) и светозащитной функции каротиноидов (б) (Krisinsky, 1971.)

Сенс - фотосенсибилизатор, Кар - каротиноид, Ст и А - субстрат фотоокисления.

Интенсивные исследования этой проблемы в последующие годы подтвердили данное положение, расширили круг объектов, для которых оно справедливо, и привели к постановке вопроса о возможных механизмах участия каротиноидов в реакциях светозащиты (Krisinsky, 1971). Если каротиноиды располагаются между источником света и фотосенсибилизатором и перекрываются с последним по спектру поглощения, они могут выступать в качестве естественных фильтров. Обнаружение каротиноидов в клеточной стенке зеленых водорослей (Burszyk, 1973) не позволяет сбрасывать со счетов этот механизм.

Каротиноиды могут эффективно гасить возбуждение как молекул фотосенсибилизаторов, так и кислорода, так что возможные механизмы защитного действия каротиноидов отражают механизмы фотодинамического действия (рис. 1, б). Для эффективного гашения возбуждения сенсibilизаторов (механизм II) каротиноиды должны располагаться в непосредственной близости от них на мембранах, а для нейтрализации синглетного кислорода (механизм III) необходима их надпороговая относительная концентрация, т.е. оказывается значимым количество каротиноидов в клетке. Последнее и было обнаружено при изучении светочувствительных мутантов высших растений и нефотосинтезирующих бактерий (Sander e.a., 1968; Mathews-Roth, Krisinsky, 1970).

Значимость расположения каротиноидов в структуре хлоропласта для поддержания светостойкости (механизм II) следует из работ со светочувствительными мутантами *Scenedesmus obliquus* с неизмененным составом каротиноидов. У одного из них было выявлено изменение структуры хлоропластных мембран (Bishop, 1975) и нарушение биосинтеза витамина Е, который

играет структурную роль в формировании фотосинтетического аппарата (Bazelyuk, 1974). У другого светочувствительного мутанта с нормальным каротиноидным составом первым проявлением аэробной светочувствительности было исчезновение светоиндуцируемых изменений оптической плотности с максимумом при 515 нм (Harvey, Bishop, 1974), что может отражать пространственное разобщение молекул каротиноидов и фотосенсибилизатора (Mathis, 1969).

Если роль сенсибилизатора приписать хлорофиллу, использование энергии возбужденных молекул хлорофилла в реакционных центрах фотосистем можно рассматривать как защитный механизм (рис.1,  $\delta$ ). Действительно, светочувствительные пластомные мутанты высших растений характеризуются нарушением частных реакций фотосинтеза и структуры фотосинтетического аппарата (Fork, Heber, 1968; Herrmann, 1971, 1972). Однако в свете данных о нарушении фотосинтеза у мутантов *Chlamydomonas reinhardtii*, отобранных по их повышенной по сравнению с диким типом светостойкости (Erel, Levine, 1971), фотосинтез нельзя рассматривать исключительно как защитный механизм.

#### Расчленение системы светозащиты

Светочувствительность салатных мутантов можно однозначно приписать нарушению биосинтеза каротиноидов. У представителей этой группы либо совершенно не обнаруживаются каротиноиды, либо наблюдается уменьшенное количество всех каротиноидов, характерных для дикого типа (Stolbova, 1975). Наличие отдельных каротиноидов в следовых количествах соответствует месту этих пигментов на пути биосинтеза каротиноидов (Goodwin, 1965).

На спектрах поглощения гетеротрофных культур салатных мутантов выявляется уменьшение оптической плотности в полосе каротиноидов (480 нм) (рис.2, а). Уменьшается как количество каротиноидов на клетку, так и их количество по отношению к хлорофиллу. Количество хлорофилла на клетку также уменьшено, соотношение хлорофиллов а/б увеличено, а анализ второй производной спектра поглощения (рис.2, б) выявляет преобладание компонентов хлорофиллбелкового комплекса I-й фотосистемы. Все эти изменения в области поглощения хлорофиллов можно трактовать как опосредованные нарушением биосинтеза каротиноидов (см. Bishop, 1971).

Светло-зеленые ревертанты от салатных светочувствительных мутантов характеризуются неполнотой восстановления светостойкости, что проявляется в ингибировании роста культур этих штаммов под действием света (рис.3). Этому частичному восстановлению светостойкости соответствовала частичная же нормализация спектральных характеристик гетеротрофных культур ревертантов (рис.2). В области поглощения хлорофиллов наблюдалась нормализация соотношения хлорофиллбелковых комплексов, что можно рассматривать как указание на общую нормализацию структуры хлоропластных мембран.

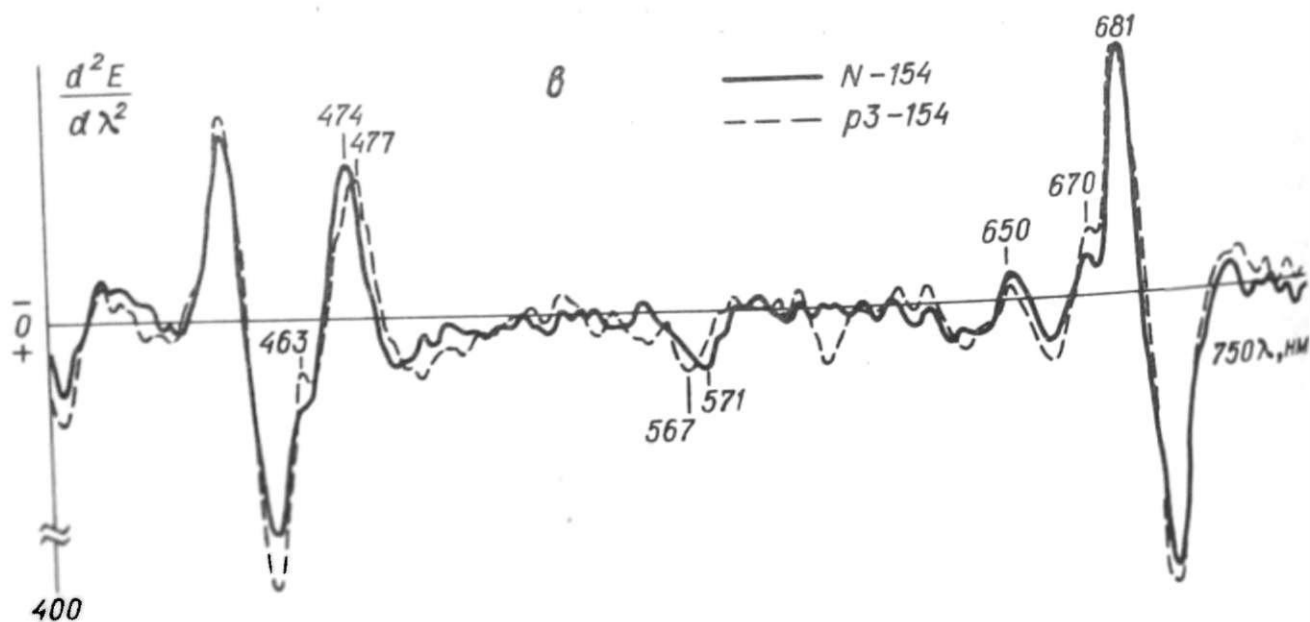
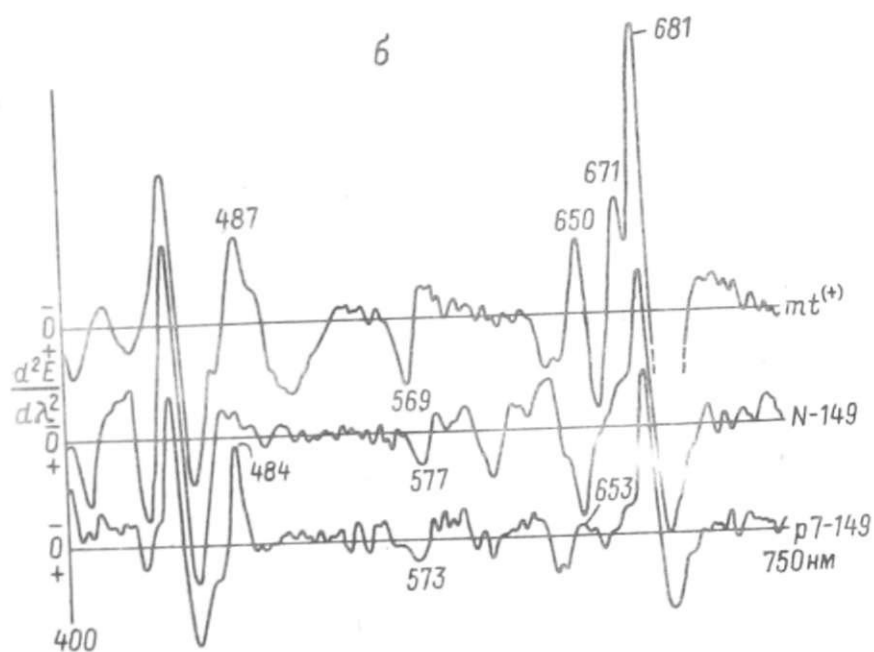
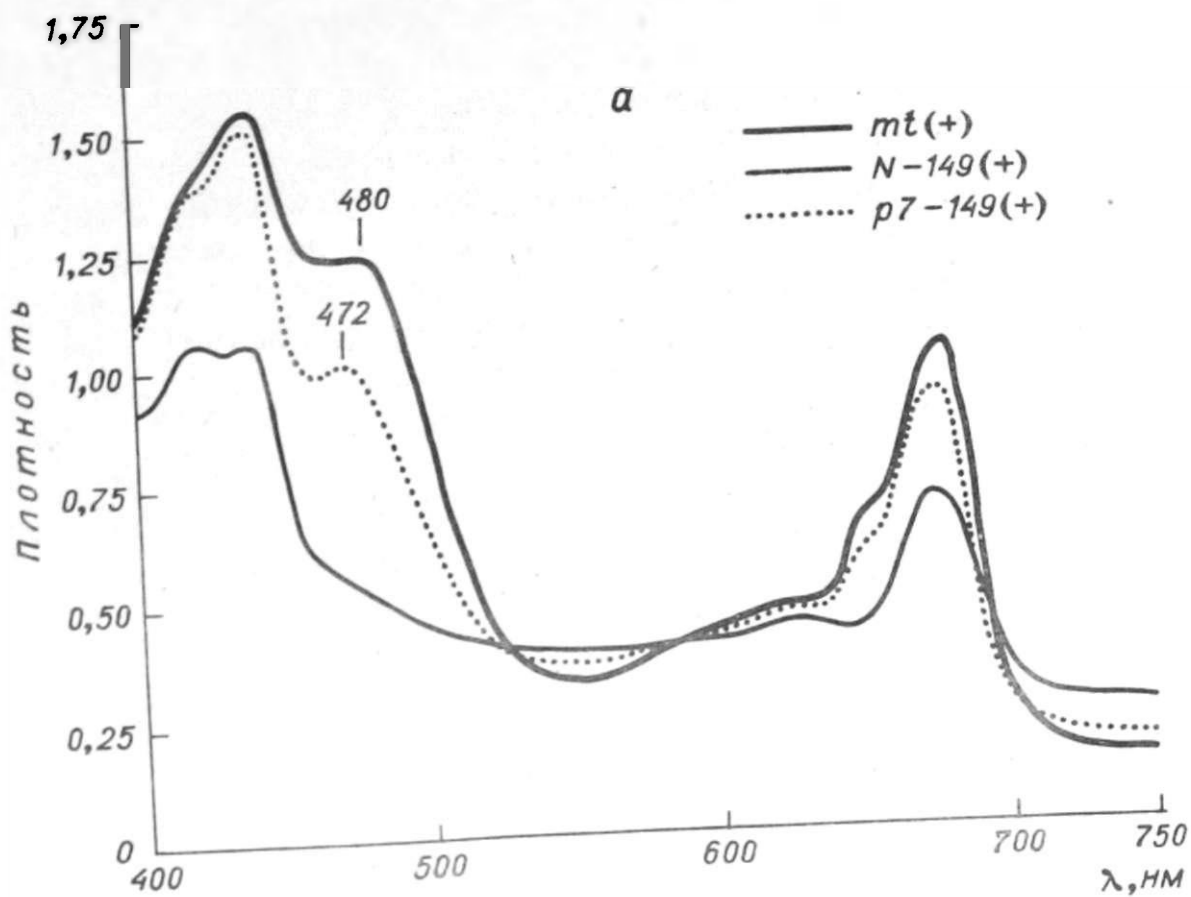
В области поглощения каротиноидов наблюдались следующие изменения: 1) увеличивалось количество каротиноидов на клетку; 2) увеличивалось отношение каротиноидов к хлорофиллу; 3) наблюдался батохромный сдвиг максимума поглощения каротиноидов (рис.2, в). Эти данные могут быть рассмот-

рены в свете представлений о механизмах участия каротиноидов в реакциях фотозащиты. Значимость концентрации каротиноидов в клетке однозначно указывает на механизм гашения синглетного кислорода, увеличение отношения каротинсиды/хлорофилл и нормализация соотношения хлорофиллбелковых комплексов — на определенную роль механизма гашения возбужденного фотосенсибилизатора. Батохромный сдвиг в области поглощения каротиноидов, наблюдающийся и на спектрах второй производной (рис.2,6), связан, по данным Майстера и Масловой (Meister, Maslova, 1968), с обратимой энзиматической деэпоксидацией эпоксикаротиноидов, для которой также предполагается функционирование в качестве защитного механизма (механизм I) (рис.1,б). Эпоксидный цикл в качестве защитного механизма действия каротиноидов принципиально отличается от первых двух механизмов, так как предполагает обратимое окисление молекул пигмента, т.е. химическое превращение, а не просто перенос энергии между молекулами.

Поскольку на батохромный сдвиг, связанный с каротиноидами, могут накладываться спектральные изменения хлорофиллов, прежде всего хлорофилла b (Meister, Maslova, 1968), для оценки участия каротиноидов в этом сдвиге мы взяли двойной мутант НГ-2, несущий кроме мутации светочувствительности, приводящей к уменьшению количества каротиноидов на клетку в гетеротрофных культурах, еще и другую мутацию, блокирующую темновой синтез хлорофиллов, и сравнили с этим мутантом полученные от него светло-зеленые светостойчивые ревертанты, сохранившие блок в темновом синтезе хлорофилла.

Батохромный сдвиг при сопоставлении спектров суспензий этих форм еще удавалось зарегистрировать (рис.2,г). При сопоставлении же молекулярных растворов каротиноидов, экстрагированных из (рис.2,д) этих форм, такого сдвига наблюдать не удалось, в то время как спектральные изменения, связанные с деэпоксидацией, по данным Яамато и др. (Yamamoto e.a., 1972) должны наблюдаться как *in vivo*, так и в растворах пигментов. Из этих наблюдений следует, что данный сдвиг, по крайней мере отчасти, обусловлен изменением положения каротиноидов в пигментлипопротеидном комплексе, а эпоксидный цикл, если и играет роль в защите клетки от фотодинамических повреждений, то не главную, а подчиненную. Главную же роль играют, по всей вероятности, процессы миграции энергии между возбужденными молекулами фотосенсибилизатора и кислорода, с одной стороны, и каротиноидов — с другой.

Другой класс светочувствительных мутантов *Chlamydomonas reinhardtii* объединяет оранжевые формы, у которых не было обнаружено снижения в содержании каротиноидов, но отмечено отсутствие хлорофиллов. На спектрах поглощения (рис.4,а) наблюдается высокая оптическая плотность в области каротиноидов. При низком содержании хлорофиллов соотношение хлорофиллов а/б также крайне низкое и свидетельствует о преобладании хлорофиллбелко-



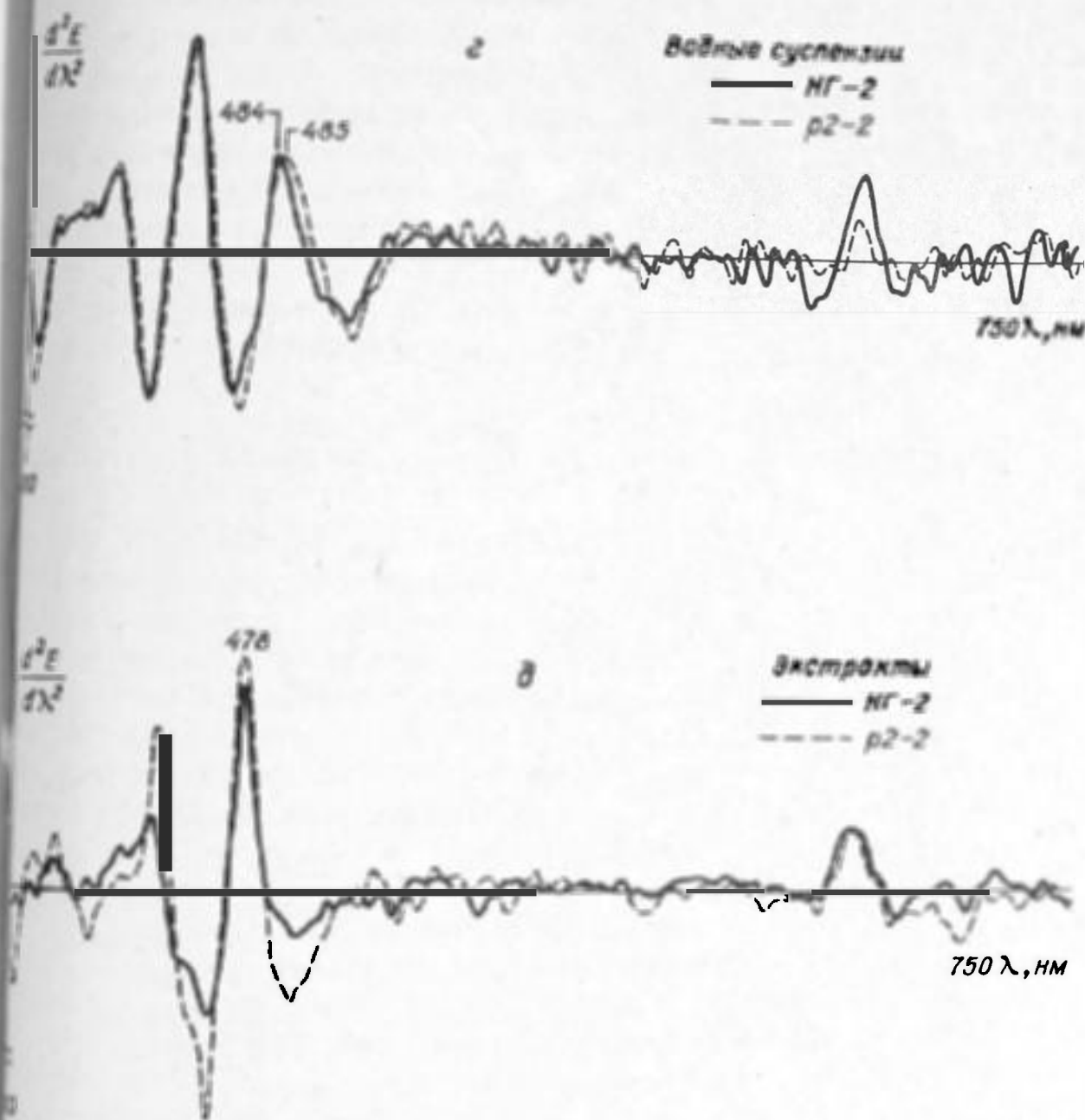


Рис.2. Спектры поглощения (а) и их вторые производные (б, в, г, д) ге-  
роторфных культур салатных светочувствительных мутантов и их светло-зе-  
леных ревертантов.

О поглощении пигментов *in vivo* судили по следующим полосам поглоще-  
ния: каротиноидов - 480 нм, хлорофилла «а» - 670-680 нм, хлорофилла «b»  
- 650 нм. Соотношение хлорофиллов а/б *in vivo* соответствует соотношению  
БК-ов I и II (Alberte e.a., 1974). Ост. объяснения в тексте.



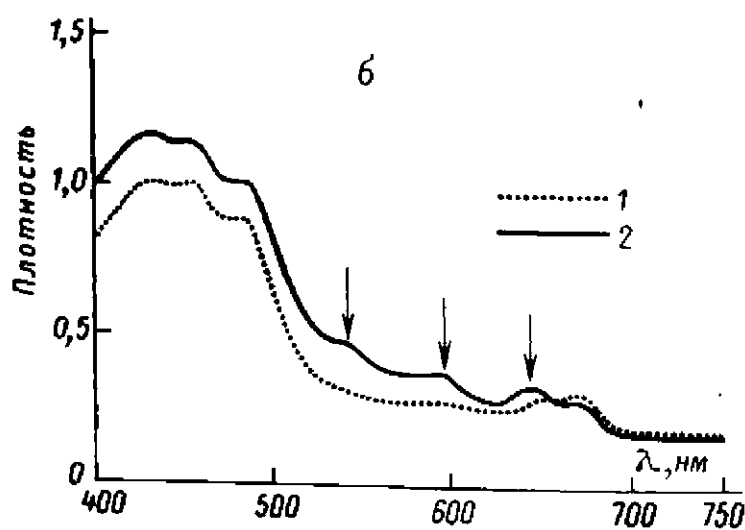
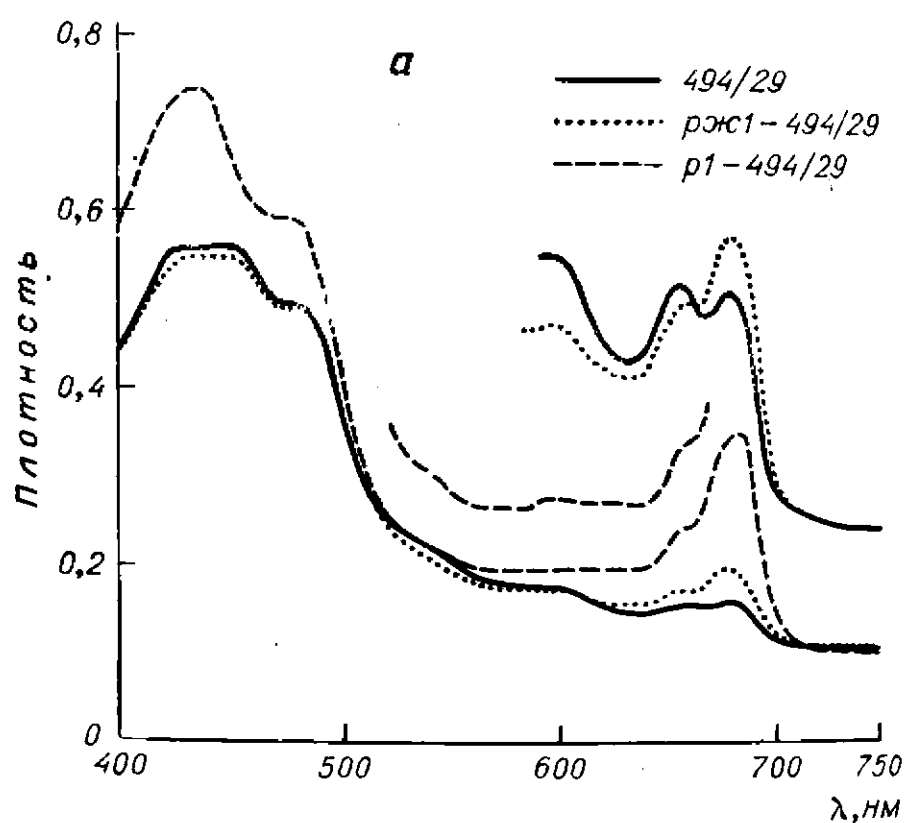
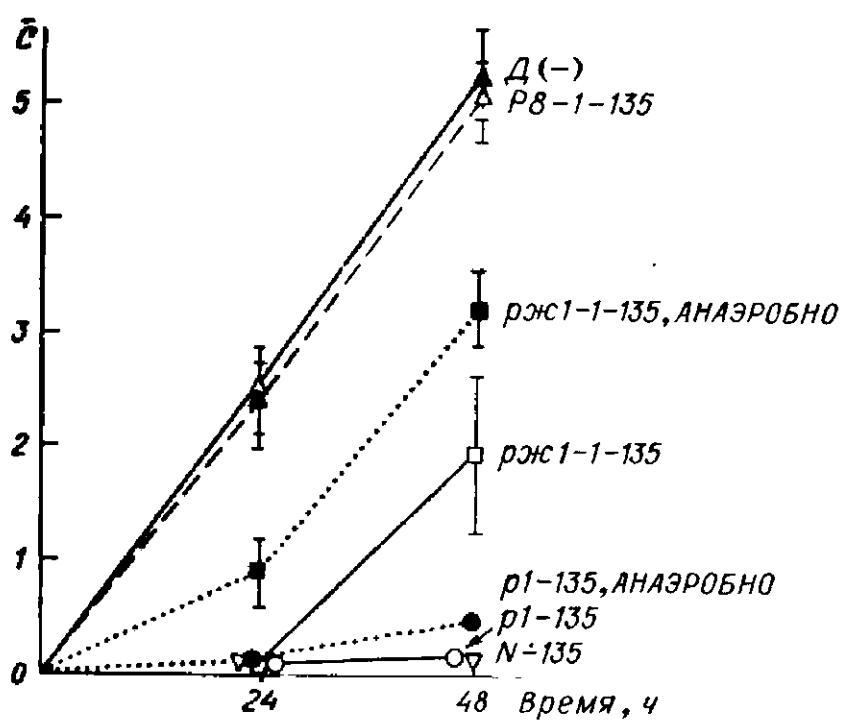


Рис. 4. Фенотип оранжевых светочувствительных мутантов.

а — спектры поглощения гетеротрофных культур мутанта 494/29, его желтого (рж1-494/29) и светло-зеленого (p1-494/29) ревертантов; б — спектры поглощения гетеротрофных культур двойного  $lts_3-sr_1$  мутанта, выращенных в присутствии стрептомицина, 30 мгк/мл (1) и без антибиотика (2).



этого комплекса 2-й фотосистемы. То, что белковая часть этого комплекса транслируется в цитоплазме (Machold, Aurich, 1972), указывает на возможную связь природы нарушений у оранжевых мутантов с белковым синтезом в хлоропласте.

На спектрах поглощения гетеротрофных культур оранжевых мутантов кроме полос хлорофиллов и каротиноидов присутствуют максимумы около 545, 600 и 645 нм, которые соответствуют красным включениям, накапливаемым в этих культурах. Спектральные характеристики этих включений сходны с таковыми brown-мутантов *Chlamydomonas reinhardtii*, накапливающих протопорфирин I (Wang e.a., 1974). Ослабление накопления красных включений при действии стрептомицина на двойной  $lts_3sr_1$ -мутант (рис.4,δ), на наш взгляд, подтверждает предположение, что эти включения являются продуктами деградации хлорофилла и, во всяком случае, свидетельствует о сложной природе красных включений у мутантов *Chlamydomonas reinhardtii* (см.также Wang e.a., 1974).

Вышеприведенная характеристика оранжевых мутантов заставляет искать причину их светочувствительности в нарушении структурного состояния пигментов.

Высокое содержание каротиноидов при нарушении структуры хлоропласта может даже способствовать проявлению светочувствительности (Harnischfeger, Caffron, 1970).

При сопоставлении спектров поглощения гетеротрофных культур желтого ревертанта рж-1-494/29 и исходного мутанта 494/29 у ревертанта не удается зарегистрировать увеличения содержания каротиноидов, в то время как в области поглощения хлорофиллов наблюдается нормализация соотношения хлорофиллов а/б и, следовательно, хлорофиллбелковых комплексов (рис.4,а). У светло-зеленого ревертанта от этого же мутанта р1-494/29 наблюдается еще более полная нормализация структурного состояния хлорофиллов. Уменьшение поглощения красных включений у ревертантов дает дополнительные основания рассматривать эти включения как показатель нарушения структуры хлоропласта.

Класс зеленых светочувствительных мутантов включает формы, не отличающиеся от дикого типа по набору, количеству и состоянию основных пигментов пластиды (Stolbova, 1975; Столбова и др., 1975). На этом основании А.В.Столбова (1974) постулировала белковый компонент в системе светозащиты, с которым и связывала причину гибели зеленых мутантов на свету.

#### Реконструкция системы светозащиты

Темно-зеленые ревертанты от салатных светочувствительных мутантов не отличались от штаммов дикого типа по скорости роста на свету (рис.3). Тетрадный анализ скрещиваний темно-зеленых ревертантов от салатных светочувствительных мутантов со штаммами дикого типа не выявил светочувствительных рекомбинантов (табл.1). Семейный анализ 626 тетрад скрещивания П-149(+) x пт(-) также их не выявил. В случае темно-зеленых ревертантов причиной восстановления светостойчивости следует считать обратную мутацию или внутригенную супрессию. Гипотезу о супрессии, не сцепленной с

Т а б л и ц а 1

Тетрадный анализ скрещиваний с участием ревертантов от  $lts_1$ -мутантов *Chlamydomonas reinhardtii*, (по Чучасву, 1973)

№	Скрещивание	Генотипы	Типы тетрад						Исключительные
			Полные				Неполные		
			P	N	T	P соот- ветст- вия I:I:4	P	N+T	
501	PI-I49(+) x mt(-)	lts <sup>+</sup> x lts <sub>1</sub> <sup>+</sup>	14(626)*				6		4
502	mt(+) x P8-I-I35(-)	lts <sup>+</sup> x lts <sup>+</sup>	18				7		
503	N-I49(+) x P8-I-I35(-)	lts <sub>1</sub> x lts <sup>+</sup>	23						
504	PI-I49(+) x P3-2/I35(-)	lts <sup>+</sup> x lts <sub>1</sub> <sup>+</sup>	32				9		
505	PI-I49(+) x pжI-I54(-)	lts <sub>1</sub> lut <sub>1</sub> <sup>+</sup> x lts <sub>1</sub> lut <sub>1</sub>	13	8	31	> 0,05	3	6	10
506	PI-I49(+) x p3-I54(-)	lts <sub>1</sub> <sup>+</sup> sup <sup>+</sup> x lts <sub>1</sub> sup <sub>1</sub>	5	10	41	> 0,05	12	6	
507	P8-I49(+) x 505-36-4(-)	lut <sub>1</sub> <sup>+</sup> x lut <sub>1</sub>	12						
508	p6-I49(+) x mt(-)	lts <sub>1</sub> sup <sub>6</sub> x lts <sub>1</sub> <sup>+</sup> sup <sub>6</sub> <sup>+</sup>	5	6	20	>0,05	1	1	1
509	Ж-3(+) x 505-36-4(-)	lut <sub>1</sub> x lut <sub>1</sub>	(374)*						

Данные семейного анализа.

исходной мутацией, можно отклонить. Темно-зеленые ревертанты от мутанта N-149 были использованы в дальнейшем в качестве аналогов дикого типа из-за хорошей фертильности скрещиваний с их участием.

Скрещивание желтого ревертанта рж I-154 (-) с аналогом дикого типа N-149(+) показало, что фенотип желтого ревертанта обусловлен взаимодействием двух несцепленных мутаций: одна из них - исходная мутация  $lts_1$ , другая - тоже пигментная мутация,  $lutescens_1$ , обладающая четким самостоятельным фенотипическим эффектом (рис.5). В этом скрещивании наблюдалось соотношение типов тетрад 13 : 8 : 31 в полных тетрадах (табл.1), которое не позволяет установить сцепления между этими мутациями. Для неполных тетрад P:(N+T) было 3 : 6.

В этом скрещивании наблюдалось, кроме того, образование 9 нерегулярных тетрад и одной октады, где расщепление по гену  $lut_1$  было соответственно 3 : 1 и 7 : 1 в пользу нормальной аллели данного гена. Факт октадного расщепления, а также расщепление 4 : 4 по гену  $lut_1$  в 12 октадах скрещивания  $lut_1lts_1$ -рекомбинанта 505-36-4(-) на темно-зеленый ревертант P8-149(+) (табл.1) свидетельствуют против полигенной схемы наследования признака *Lutescens* в качестве объяснения нерегулярности расщепления. Аберрантные расщепления в скрещивании N-149(+) x рж I-154(-) можно объяснить из предположения о высокой частоте конверсии в гене  $lut_1$  либо на основе допущения специфического взаимодействия факторов  $lts_1$  и  $lut_1$ .

В потомстве от скрещивания фенотипически сходных мутантных штаммов Ж-3(+) x 505-36-4(-) не было обнаружено рекомбинантов, т.е. родительские формы несут рекомбинационно аллельные изменения (ген  $lut_1$ )\*.

Самостоятельный фенотипический эффект мутации  $lut_1$  проявляется в том, что гетеротрофные культуры  $lut_1$ -штаммов содержат хлорофилла меньше, чем штаммы дикого типа, причем хлорофилл представлен в основном компонентами хлорофиллбелкового комплекса 2-й фотосистемы (рис.5,а).

К выводу о преобладании компонентов 2-й фотосистемы у  $lut_1$ -штаммов можно прийти и при анализе данных Семеновой и Ладыгина (1975), показавших наличие в гетеротрофных культурах мутанта Ж-3 мощных гран, которые почти не соединяются межгранными ламеллами.

У желтого ревертанта рж I-154 наблюдается промежуточное соотношение хлорофиллбелковых комплексов между таковым для исходного мутанта N-154 и противоположным ему, характерным для  $lts_1^+lut_1$ -рекомбинантов. Поскольку у рж I-154 преобладают компоненты ХБК 2-й фотосистемы, можно заключить, что мутация  $lut_1$  эпистатирует проявление мутантной аллели  $lts_{1-154}$  на уровне соотношения хлорофиллбелковых комплексов. Рассматривая изменение этого соотношения в связи с восстановлением светостойкости желтых ревертантов, следует допустить, что оно отражает такое изменение структуры хлоропластных мембран, которое позволяет каротиноидам более адекватно располагаться в пигментбелковом комплексе для выполнения ими светозащитной функции.

Действие света на  $lut_1$ -штаммы приводит к полному выцветанию хлорофилла, синтезирующегося в темноте (рис.5,б). Название мутации *lutescens*

\* Автор благодарит В.Г.Ладыгина за предоставление мутанта Ж-3(+).

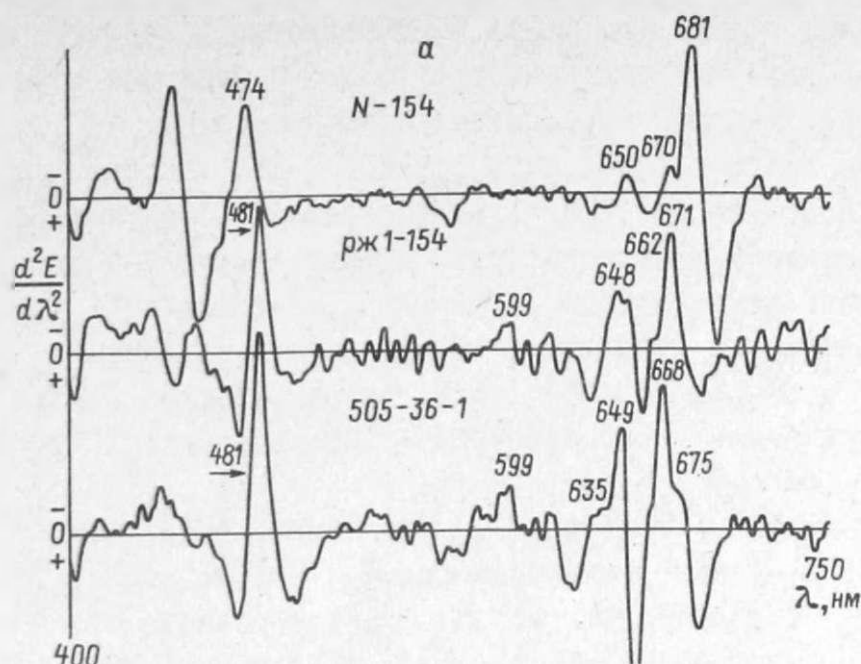
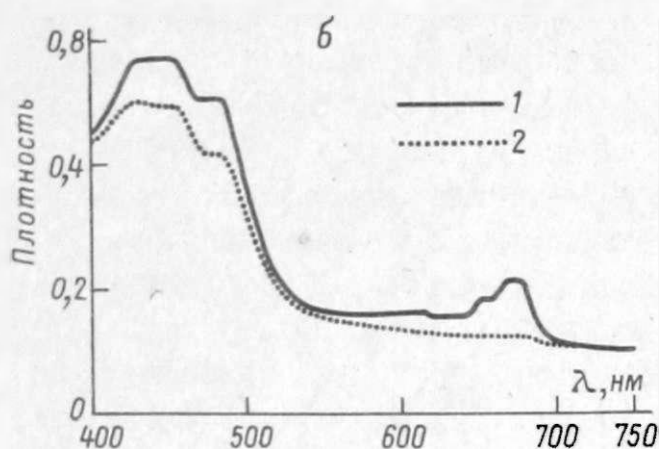


Рис.5. Фенотипическое проявление мутации  $lut_1$ .



$\alpha$  - вторые производные спектров поглощения гетеротрофных культур:  $lts_1lut_1^+$  - мутанта N-154,  $lts_1lut_1$  - ревертанта рж1-154 и  $lts_1^+lut_1$  - рекомбинанта 505-36-1;  $\delta$  - спектры поглощения культур  $lut_1$  - штамма 505-2-4, выращенного в темноте (1) и на свету (2).

отражает специфику реакции на свет этих форм (пожелтение). Гибели клеток  $lut_1$ -штаммов под действием света не наблюдается, т.е. система светозащиты гетеротрофно питающейся клетки функционирует вполне эффективно, но нарушена система защиты фотосинтетического аппарата. Мутантная аллель гена  $lut_1$  низводит клетку на более ранний этап эволюции системы светозащиты, когда клетка уже защищена от гибели на свету, но светостойчивость компонентов ее фотосинтетического аппарата еще не обеспечена.

Клетка защищена от гибели надпороговым количеством каротиноидов, специфически локализованных на мембране. Эти каротиноиды у  $lut_1$ -штаммов оказываются неэффективными в обеспечении светостойчивости хлорофиллов светособирающего ХБК 2-й фотосистемы. В то же время устойчивость фотосинтетического аппарата, характеризующегося преобладанием ХБК 1-й фотосистемы, требует прежде всего наличия каротиноидов, что следует из рассмотрения салятных светочувствительных мутантов и их светло-зеленых ревертантов (см. выше). Таким образом, на основании изучения фенотипа  $lut_1$ -штаммов приходится допускать, что светособирающий ХБК 2 требует для своей светостойчивости еще и оттока энергии в реакционные центры фотосистем.

В попытке объяснить преимущественное фотовыцветание хлорофилла b у фенотипически сходных мутантов *Scenedesmus obliquus* А.А.Баранов и др.

(1975) предположили, кроме того, повышенную светочувствительность предшественника хлорофилла *b* - особого фонда новообразованных молекул хлорофилла *a*.

Для сопоставления светостойкости *lut<sub>1</sub>*-штаммов, обладающих эволюционно менее развитой системой светозащиты, с устойчивостью штаммов дикого типа, те и другие высевали на среду, содержащую фотодинамический краситель эритрозин. В то время как в темноте в гетеротрофных условиях развивались колонии и тех и других форм, на свету рост *lut<sub>1</sub>*-штаммов отсутствовал, т.е. они проявляли признак светочувствительности (табл.2). Это наблюдение подтверждает следующие положения. Светостойкость желтых ревертантов от салатных светочувствительных мутантов есть результат взаимодействия мутаций, каждая из которых нарушает определенные компоненты системы светозащиты. Те компоненты системы, которые ответственны в первую очередь за защиту фотосинтетического аппарата, принимают участие и в обеспечении светостойкости клетки как целого и, таким образом, расчленение системы светозащиты на две подсистемы с помощью мутации *lut<sub>1</sub>* в значительной степени условно.

Несмотря на свою условность выделение в пределах светозащиты двух сопряженных подсистем оказывается полезным при рассмотрении возможных причин светочувствительности тех мутантов, для которых нехарактерно уменьшение содержания каротиноидов. Сходство спектральных характеристик *lut<sub>1</sub>*-рекомбинантов и оранжевых светочувствительных мутантов (ср.рис.5 и 4) заставляет связывать губительность света для последних с измененным соотношением ХБК I-й и 2-й фотосистем и наличием красных включений. Именно нарушением нормальной структуры хлоропласта и невозможностью по этой причине нормальной связи каротиноидов в пигментбелковый комплекс и удается объяснить светочувствительность оранжевых светочувствительных мутантов. У желтых ревертантов от этих мутантов восстанавливается лишь светостойкость гетеротрофно существующих клеток, а у светло-зеленых - и светостойкость фотосинтетического аппарата.

Сопоставление спектров поглощения гетеротрофных культур этих форм (рис.4) согласуется с нашим предположением о необходимости определенной степени нормализации соотношения ХБК для светостойкости фотосинтетического аппарата.

Противоположная ситуация, когда нарушение затрагивает прежде всего обеспечение светостойкости гетеротрофно существующей клетки, возможно, имеет место у зеленых светочувствительных мутантов *Chlamydomonas reinhardtii*. Количество, состояние и кинетика фотовыцветания основных пигментов пластиды не изменены у этих мутантов по сравнению с диким типом; они не утратили способность к фотосинтетическому усвоению  $CO_2$  (Столбова и др., 1975). Ослабление светочувствительности этих форм при переходе с миксотрофного типа питания на фотоавтотрофный (Stolbova, 1975) может служить основанием для предположения, что тип органического питания регулирует уровень развития системы обеспечения светостойкости клетки *Ch. reinhardtii* как целого. Такого рода регуляция наблюдалась и в отношении развития хлоропластных структур у мутанта *Ch.reinhardtii ac-20* (Goodenough, Levine, 1970). Светочувствительность удавалось заметно модифицировать

Фенотип супрессорных мутаций. Рост и пигментация колоний.

Т а б л и ц а 2

Штаммы	Генотип	Условия культивирования						
		Темнота		Свет				
		L2 <sub>мин</sub> L2 <sub>мин</sub> +ЭР, 10г L2 <sub>мин</sub> +ЛФА, 1г	L2 <sub>б/ац</sub> L2 <sub>б/ац</sub> +ЭР, 4г L2 <sub>мин</sub> +ЛФА, 4г	L2 <sub>мин</sub>	L2 <sub>мин</sub> + +ЭР, 10г	L2 <sub>мин</sub> + +ЛФА, 4г	L2 <sub>б/ац</sub>	L2 <sub>б/ац</sub> +ЛФА, 4г
mt(-)								
PI-149								
P8-149	Дикие							
506-50-2	типы	Т.-з.	-	Т.-з.	Т.-з.	Т.-з.	Т.-з.	Т.-з.
506-19-7								
N-154	lts <sub>1</sub>	Сал.	-	-	-	С.-з.	-	-
p3-154	lts <sub>1</sub> sup <sub>1</sub>	С.-з.	-	С.-з.	-	С.-з.	С.-з.	-
506-50-1	sup <sub>1</sub>	Т.-з.	-	Т.-з.	-	-	Т.-з.	-
506-19-4								
pж1-154	lts <sub>1</sub> lut <sub>1</sub>	Б.-ж.-з.	-	Ж.	-	-	-	-
505-2-4								
505-3-2	lut <sub>1</sub>	Ж.-з.	-	Ж.	-	-	-	-
505-36-4		Ж.-з.	-	Ж.	-	-	-	-

П р и м е ч а н и е: Окраска культур: Т.-з. - темно-зеленая; С.-з. - светло-зеленая; Сал. - салатная; Б.-ж.-з. - бледно-желто-зеленая; Ж.-з. - желто-зеленая; Ж. - желтая окраска колоний. Среда: L2<sub>мин</sub> - минимальная среда с ацетатом, L2<sub>б/ац</sub> - среда без ацетата.



сменой источников органического питания и у мутантов *Euglena gracilis* (Cook, Kaiser, 1973).

Нарушение подсистемы обеспечения светоустойчивости гетеротрофно существующей клетки, по-видимому, имеет место и у салатных светочувствительных мутантов, некоторые представители которых сходны с зелеными светочувствительными мутантами, например, светоустойчивость на среде с дифениламином восстанавливается и у зеленого мутанта N-174 и у салатного мутанта N-154.

В скрещиваниях светло-зеленых ревертантов от салатных светочувствительных мутантов со штаммами дикого типа регулярно появлялись светочувствительные рекомбинанты. Предполагая, что они возникли в результате рекомбинации между мутацией  $lts_1$  и супрессорной мутацией, мы вычислили соотношение типов тетрад P:N:T, которое для полных тетрад скрещивания P-149(+) x p3-154(-) было 5:10:41, что статистически не отличается от 1:1:4 (см. табл. 1). Учитывая, что недостаток тетрад родительского дитипа компенсирован их избытком в группе неполных тетрад, где P:(N:T) = 12:6, можно считать эти данные указанием на несцепленность двух мутаций ( $lts_1$  и  $sur_1$ ). Обнаруженная в этом скрещивании супрессорная мутация  $sur_1$  не обладает столь четким проявлением на уровне пигментации, как мутация  $lts_1$ , поэтому для выявления самостоятельного эффекта мутации  $sur_1$  были сопоставлены друг с другом рекомбинанты из одних и тех же тетрад тетра-типа, несущие нормальную аллель гена  $lts_1$ . Для одного из этих рекомбинантов 506-50-1 семейный анализ скрещивания с  $lts_1$ -штаммом выявил наличие мутантной аллели  $sur_1$ .

Между сравниваемыми штаммами наблюдалось различие по чувствительности к действию эритрозина на свету, что можно было приписать самостоятельному проявлению супрессорной мутации (см. табл. 2). Мутантная аллель гена  $sur_1$ , таким образом, также приводила к повышению светочувствительности по сравнению с нормальной аллелью, т.е. и в случае светло-зеленых ревертантов от салатных светочувствительных мутантов имеет место взаимодействие мутаций, каждая из которых определенным образом модифицирует компоненты системы светозащиты.

Среди других эффектов мутации  $sur_1$  следует рассмотреть еще 2: ослабленную скорость роста культур в фотоавтотрофных условиях и чувствительность к свету в присутствии дифениламина (ДФА). ДФА является эффективным ингибитором фотосинтеза с местом действия в пределах 2-й фотосистемы (Ogawa e.a., 1970). Нарушение роста светло-зеленого ревертанта p3-154 в фотоавтотрофных условиях в присутствии ДФА и фенотипическая супрессия светочувствительности мутанта N-154 этим же агентом (см. табл. 2) указывают на связь проявления мутации  $sur_1$  с частными реакциями фотосинтеза и на близость места действия мутации  $sur_1$  и ДФА.

Тетрадный анализ скрещивания светло-зеленого ревертанта от аллельного светочувствительного мутанта p6-149(+) x mt(-) показал, что и в этом случае мы имеем дело с несцепленной супрессорной мутацией (см. табл. 1). По чувствительности рекомбинантов с дикой аллелью мутации  $lts_1$  к ДФА на свету во всех тетрадах этого скрещивания наблюдалось расщепление, соответствующее предположению, что самостоятельный эффект супрессорной мутации и в этом случае связан с повышением чувствительности к ДФА на свету.



Изучение данной системы мутаций сулит выяснение связи компонентов системы светозащиты и частных реакций фотосинтеза. В настоящий момент можно лишь отметить, что имеющиеся в нашем распоряжении, а также литературные данные (Erel, Levine, 1971; Harvey, Bishop, 1974) согласуются с предположением о кооперативном участии двух фотохимических систем фотосинтеза в обеспечении светостойкости.

### З а к л ю ч е н и е

Итак, изучение коллекции светочувствительных мутантов, их ревертантов и самостоятельного проявления двух супрессорных мутаций позволило понять причины светочувствительности салатных и оранжевых светочувствительных мутантов и обсуждать возможные причины гибели на свету зеленых форм. Изучение самостоятельного проявления супрессорной мутации *lut<sub>1</sub>* позволило выявить наличие в пределах системы светозащиты *Chlamydomonas reinhardtii* двух сопряженных подсистем, одна из которых обеспечивает устойчивое существование гетеротрофно существующей клетки *Ch. reinhardtii* на свету, а другая, более сложная, — устойчивость фотосинтетического аппарата от фотодеструкции. В фотосинтезирующей клетке имеет место взаимодействие компонентов этих подсистем, в котором определенную роль играет соотношение ХБК I-й и 2-й фотосистем. По-видимому, нормальная структура хлоропластных мембран обеспечивает близость молекул фотосенсибилизаторов и каротиноидов и, таким образом, эффективность функционирования последних в системе светозащиты (рис.6). С обеспечением светостойкости связаны и



Рис.6. Возможная роль структурной организации фотосинтетических мембран в определении расположения каротиноидов (Кар) по отношению к фотосенсибилизаторам.

Фотосенсибилизаторы: Фп — флавопротеин, Цит — цитохромы, А, В — хлорофиллы а и б Р700, Хл.АII — хлорофилл а реакционных центров I-й и 2-й фотосистем. ПБК I и ПБК II — пигмент-белковолипидные комплексы I-й и 2-й фотосистем. Стрелками обозначено направление переноса электрона на участке электронно-транспортной цепи фотосинтеза, представленном на схеме.

белоксинтезирующие системы 70S- и 80S-рибосом, так как, во-первых, синтезируется на 70S-а ХБК 2 - на 80S-рибосомах (Machold, Aurich, 1972), а во-вторых, эти белоксинтезирующие системы кооперативно обеспечивают синтез каротиноидов (Sirevag, Levine, 1973). Рассмотрение действия антибиотиков на светочувствительность коллекционных штаммов *Ch.reinhardi* приводит к заключению, что компоненты, обеспечивающие светоустойчивость гетеротрофно существующей клетки на свету, транслируются преимущественно на 80S-рибосомах, в то время как для обеспечения светоустойчивости фотосинтетического аппарата необходима кооперация белоксинтезирующих систем 70S- и 80S-рибосом (Чунаев и Закова, 1974).

Дальнейшее изучение коллекции мутантных штаммов *Chlamydomonas reinhardi* позволит углубить наши знания о компонентах системы светозащиты этой зеленой водоросли и выявить механизмы их взаимодействия.

#### S u m m a r y

Lightsensitive mutants of the green alga *Chlamydomonas reinhardi*, their lightresistant revertants and the own phenotypical effects of the suppressor mutations were studied. This investigation allow to subdivide the photoprotective system of this organism into two subsystems. The first of them is responsible for photoprotection of heterotrophically growing cells, and contains certain overthreshold amounts of carotenoids specifically bound in the pigment-protein complex. The photoprotection of photosynthetic apparatus requires additionally a certain ratio of the two main chlorophyll-protein complexes of the chloroplast. The cooperation of the two photosystems of the photosynthesis appears to play significant role in preventing the photosynthetic apparatus from photodestruction. The components of the system of photoprotection of the heterotrophically existing cells are translated mainly on 80S-ribosomes, where both synthesis on 70S- and on 80S-ribosomes seems to be necessary for protection of chlorophyll from photodestruction. Further attempts are made to elucidate the mechanisms of interaction of the photoprotective systems in *Chlamydomonas reinhardi* mutant strains.

#### У к а з а т е л ь л и т е р а т у р ы

- Баранов А.А., Сааков В.С., Чунаев А.С. и др. Исследования реакции хлорофиллообразования и светозащиты у мутантов зеленых водорослей методом абсорбционной спектрофотометрии. - "Физиол. растений". 1975, т.22, вып.4, с.702-711.
- Семенова Г.А., Ладыгин В.Г. Ультраструктура пластид трех типов мутантов *Chlamydomonas reinhardi* фенотипически желтых на свету или в темноте. - "Цитология", 1975, т.17, вып.9, с.1003-1008.
- Столбова А.В. Изучение летального действия света на пигментные мутанты хламидомонады. - В кн.: Материалы VIII Всесоюз.рабочего совещания по вопросу круговорота веществ в замкнутой системе на основе жизнедеятельности низших организмов. Киев, 1974, с.141-142.

- С т о л б о в а А.В., Г и л л е р Ю.Е., В а х и д о в а Л.Р. и др.  
 Состав и состояние основных пигментов пластид и функционирование  
 тосинтетического аппарата у зеленых светочувствительных мутантов  
 хламидомонады. - В кн.: Генетика фотосинтеза. Душанбе, 1975.
- Ч у н а е в А.С., З а к о в а Н.С. Генетическая реконструкция системы  
 светозащиты у *Chlamydomonas reinhardi*. - В кн.: Тезисы совещания  
 по теме: "Изучение физиологии культивирования водорослей с высоким  
 коэффициентом использования света". Л., 1974, с.14.
- A l b e r t e K.S., H e s k e t h J.D., H o f s t r a G. e.a.  
 Composition and activity of the photosynthetic apparatus in tempe-  
 rature-sensitive mutants of higher plants. - "Proc. Natl. Acad. Sci.  
 USA", 1974, vol.71, N 6, p.2414-2418.
- B a s z y n s k i T. Effect of -tocopherol on reconstitution of  
 photosystem 1 in heptane-extracted spinach chloroplasts. - "Biochim.  
 Biophys. Acta", 1974, vol.347, N 1, p.31-35.
- B i s h o p N.I. Photosynthesis: the electron transport system of green  
 plants. - "Ann. Review of Biochemistry", 1971, vol.40, p.197-226.
- B i s h o p N.I. On photosystem 2 activity and chloroplast ultrastruc-  
 ture in a mutant of *Scenedesmus obliquus* deficient in vitamin E.-  
 In: Abstracts of the 12 International Botanical Congress, Leningrad,  
 1975, vol.2, p.397.
- B u r c z y k J. The chemical composition of the cell wall of *Scenedes-  
 mus obliquus*. 1. General Chemical Characteristics. - "Folia histo-  
 chemica et cytochemica", 1973, vol.11, N 2, p.119-134.
- C o o k J.R., K a i s e r Jr. Factors affecting pH-dependent photoin-  
 hibition of division in *Euglena gracilis*. - "J. Cell. Physiol.",  
 1973, vol.82, N 3, p.489-496.
- E p e l B.L., L e v i n e R.P. Mutant strains of *Chlamydomonas rein-  
 hardi* with lesion on the oxidizing side of photosystem 2. -  
 "Biochim. Biophys. Acta", 1971, vol.226, p.154.
- F o o t e C.S. Mechanism of photosensitized oxidation. - "Science",  
 1968, vol.162, p.963-970.
- F o r k D.C., H e b e r U.H. Studies on electron-transport reactions  
 of photosynthesis in plastome mutants of *Oenothera*. - "Plant Physio-  
 logy", 1968, vol.43, N 4, p.606-612.
- G o o d e n o u g h U.W., L e v i n e R.P. Chloroplast structure and  
 function in ac-20, a mutant strain of *Chlamydomonas reinhardi*. III.-  
 "J. Cell. Biol.", 1970, vol.44, N 3, p.547.
- G o o d w i n T.W. The biosynthesis of carotenoids.-In: Chemistry and  
 Biochemistry of Plant Pigments. Academic Press. Ed. by T.W.Goodwin,  
 N.Y. - London, 1965, p.143-173.
- H a r n i s h f e g e r G., G a f f r o n H. Transient light effects  
 in the Hill reaction of disintegrating chloroplasts in vitro. -  
 "Planta (Berl.)", 1970, vol.93, N 1, p.89-105.
- H a r v e y G.W., B i s h o p N.I. On the photolability of cyclic  
 photophosphorylation in a noncarotenogenic mutant of *Scenedesmus  
 obliquus*. - "Plant Physiol.", 1974, vol.53, N 5(suppl.), p.72.
- H e r r m a n n F. Genetic control of pigment-protein complexes 1 and  
 1a of the plastid mutant en:alba-1 of *Antirrhinum majus*. - "FEBS  
 Letters", 1971, vol. 19, N 3, p.267-269.

- Herrmann F. Chloroplast lamellar proteins of the plastid mutant *en:viridis 1* of *Antirrhinum majus*, having impaired photosystem II. - "Experimental Cell Research", 1972, vol.70, N 2, p.452-453.
- Krinsky N.I. The protective function of carotenoid pigments. - In: Photophysiology, vol.3, N.Y. - London, 1968, p.123-195.
- Krinsky N.I. Function. - In: Carotenoids. Ed. by Otto Isler. Birkhauser Verlag. Basel, 1971, p.669-716.
- Machold O., Aurich O. Sites of synthesis of chloroplast lamellar proteins in *Vicia vaba*. - "Biochim. Biophys. Acta", 1972, vol.281, N 1, p.103-112.
- Mathews - Roth M.M., Krinsky N.I. Studies on the protective function of the carotenoid pigments of *Sarcina lutea*. - "Photochem. Photobiol.", 1970, vol.11, p.419-428.
- Mathis P. Etude par spectroscopie de la transference d'energie chlorophylle-carotenoide. - "Photochem. Photobiol.", 1969, vol.9, N 1, p.55-63.
- Meister A., Maslova T.G. Die Bestimmung der lichtinduzierten Absorptionsanderungen durch Messung der 2. Ableitung der Extinktion. - "Photosynthetica", 1968, vol.2, N 4, p.261-267.
- Ogawa T., Vernon L.P., Yamamoto H.Y. Properties of *Anabaena variabilis* cells, grown in the presence of diphenylamine. - "Biochim. Biophys. Acta", 1970, vol.197, N 2, p.302-307.
- Sager R., Zalokar M. Pigments and photosynthesis in a carotenoid-deficient mutant of *Chlamydomonas*. - "Nature", 1958, vol.182, N 4628, p.98-100.
- Sander C., Laber L.J., Bell W.D. e.a. Light sensitivity of plastids and plastid pigments present in the albescent maize mutant. - "Plant Physiol.", 1968, vol.43, N 5, p.693-697.
- Sirevag R., Levine R.P. Transcription and translation for carotenoid synthesis in *Chlamydomonas reinhardtii*. - "Planta (Berl.)", 1973, vol.111, N 1, p.73-84.
- Sistrom W.K., Griffith M., Stanier R.Y. The biology of a photosynthetic bacterium which lacks colored carotenoids. - "J. Cell. and Comp. Physiol.", 1956, vol.48, N 3, p.473-515.
- Spike J.D. Photodynamic Action. - In: Photophysiology, vol.3, N.Y. - London, 1968, p.33-64.
- Stolbova A.V. Genetic analysis of light-sensitive mutants of *Chlamydomonas reinhardtii*. - In: Genetic Aspects of Photosynthesis. Ed. by Yu.S. Nasyrov and S. Sestak. Dr.W.Junk B.V. Publishers, The Hague, 1975, p.217-223.
- Wang W.Y., Wang W.L., Boynton J.E. e.a. Genetic control of chlorophyll biosynthesis in *Chlamydomonas*. Analysis of mutants at two loci mediating the conversion of protoporphyrin IX to magnesium protoporphyrin. - "J. Cell. Biol.", 1974, vol.63, N 3, p.806-825.
- Yamamoto H.J., Kamite L., Wang J.J. An ascorbate-induced absorbance change in chloroplasts from *violaxanthin de-epoxidation*. - "Plant Physiol.", 1972, vol.49, N 2, p.224-228.